

# Tumor cell identification apparatus and tumor cell identification method

**Publication number:** EP1203944

**Publication date:** 2002-05-08

**Inventor:** HOFSTETTER ALFONS PROF DR MED (DE); TAUBER  
STEPHAN DR MED (DE)

**Applicant:** HOFSTETTER ALFONS PROF DR MED (DE); TAUBER  
STEPHAN DR MED (DE)

**Classification:**

**- international:** *A61K41/00; A61K49/00; G01N21/64; G01N21/05;  
A61K41/00; A61K49/00; G01N21/64; G01N21/03;  
(IPC1-7): G01N21/64; A61K41/00; A61K49/00*

**- European:** A61K41/00W4; A61K49/00P4F; G01N21/64

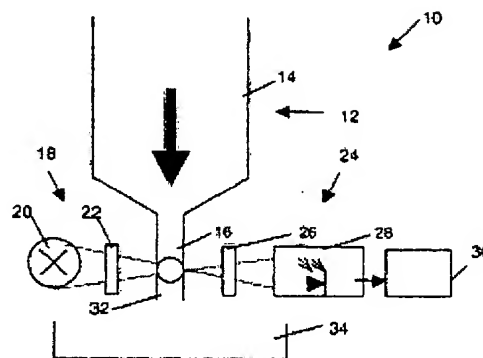
**Application number:** EP20000124107 20001106

**Priority number(s):** EP20000124107 20001106

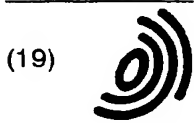
## Abstract of EP1203944

Apparatus for identifying tumor cells containing a high concentration of protoporphyrin IX in a fluid sample comprises; (a) a light source (18) which emits light with a wavelength of 400 nm; and (b) a sensor unit (24) which detects light of wavelength 630 - 700 nm emitted from the sample after irradiation. External light is excluded from the sample during irradiation. An Independent claim is included for a method for identifying tumor cells containing a high concentration of protoporphyrin IX in a fluid sample using the apparatus.

**Fig.1**



7/4



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) EP 1 203 944 A1

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
08.05.2002 Patentblatt 2002/19

(51) Int Cl.7: **G01N 21/64**, A61K 41/00,  
A61K 49/00

(21) Anmeldenummer: 00124107.4

(22) Anmeldetag: 06.11.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE TR**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

(72) Erfinder:  
• Hofstetter, Alfons, Prof.Dr.med.  
82008 Unterhaching (DE)  
• Tauber, Stephan, Dr. med.  
80803 München (DE)

(71) Anmelder:  
• Hofstetter, Alfons, Prof.Dr.med.  
82008 Unterhaching (DE)  
• Tauber, Stephan, Dr. med.  
80803 München (DE)

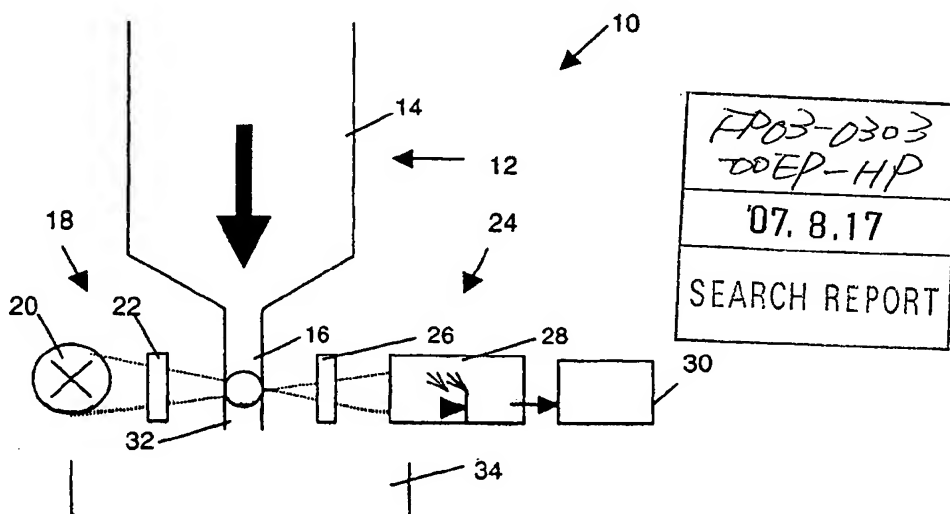
(74) Vertreter: Hofstetter, Alfons J., Dr.rer.nat. et al  
Hofstetter,Schurack & Skora  
Balanstrasse 57  
81541 München (DE)

(54) **Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung und Tumorzellenidentifizierungsverfahren**

(57) Die Erfindung betrifft eine Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung zur automatisierten in vitro Identifizierung von Tumorzellen, in denen Protoporphyrin IX angereichert ist, in einer Flüssigkeit, wobei die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) eine Lichtquelle (18) und ein Sensorelement (24) aufweist, wobei in der Flüssigkeit befindliche Zellen durch die Lichtquelle (18) mit Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm gesamtheitlich oder sequentiell, von Fremdlicht abgeschlossen bestrahlbar sind, wobei durch das Sen-

sorelement (24) eine von den Zellen in der Flüssigkeit aufgrund der Bestrahlung emittierte Lichtmenge von Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 bis 700 nm pro Zeiteinheit gesamtheitlich oder sequentiell erfaßbar ist und mindestens ein für die erfaßte Lichtmenge charakteristisches Signal erzeugbar ist, wobei die Flüssigkeit innerhalb der Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) von Fremdlicht abgeschlossen für die Bestrahlung bereitstellbar ist. Die Erfindung betrifft auch ein entsprechendes Tumorzellenidentifizierungsverfahren.

**Fig.1**



FP03-0303  
DOEP-HP  
'07.8.17  
SEARCH REPORT

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung zur automatisierten in vitro Identifizierung von Tumorzellen, in denen Protoporphyrin IX angereichert ist, in einer Flüssigkeit. Die Erfindung betrifft auch ein entsprechendes Tumorzellenidentifizierungsverfahren.

[0002] Zur Erkennung eines Harnblasenkarzinoms eines Patienten ist eine 5-Aminolävulinsäure-induzierte Fluoreszenzendoskopie bekannt. Bei diesem Untersuchungsverfahren wird einem Patienten zwei bis vier Stunden vor der endoskopischen Untersuchung mit einem Katheter 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in die Harnblase instilliert. Dabei werden 1,5 g 5-ALA in 50ml einer auf pH 4,9 gepufferten Lösung verwendet. Insbesondere in Tumorzellen wird das 5-ALA in Protoporphyrin IX umgewandelt, das bei einer Anregung mit energiereichem, blauvioletttem Licht einer Wellenlänge um 400 nm eine charakteristische rötliche Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 630 - 700 nm abgibt. Bei der nachfolgenden endoskopischen Untersuchung wird das gefilterte Licht einer Xenon-Kurzbogenlampe durch ein Beleuchtungsbündel eines Endoskops auf das Hamblasegewebe gerichtet. Zur Filterung des von der Xenon-Kurzbogenlampe erzeugten inkohärenten Lichtes wird eine Filterbeschichtung verwendet, die lediglich den blauen Spektralanteil hindurchläßt. Zur Beobachtung der Fluoreszenz, die durch das Protoporphyrin IX der Tumorzellen emittiert wird, reicht das menschliche Auge. Rückgestreutes Anregungslicht muß jedoch weitgehend weggefiltert werden, wobei der noch transmittierte Restanteil eine optimale Erkennung suspekter Areale in der Harnblase ermöglicht. Mit Hilfe der beschriebenen Fluoreszenzzytoskopie mit 5-ALA können Tumore oft sehr viel früher entdeckt und schließlich behandelt werden, als dies bei Anwendung einer konventionellen Endoskopie mit Weißlicht möglich wäre.

[0003] Ähnliche Verfahren werden inzwischen auch zur Früherkennung eines Bronchialkarzinoms, eines malignen Glioms, von Neoplasien in Mundhöhle und Larynx, einer Cervixdysplasie oder einer Endometriose, von Dysplasien bei Colitis Ulcerosa oder auch zur Früherkennung des Barrett-Ösophagus verwendet.

[0004] Beispielsweise wird bei Patienten mit Verdacht auf ein Bronchialkarzinom 5-ALA entweder inhalativ (200 bis 250 mg 5-ALA) oder oral (20 bis 40 mg 5-ALA/kg Körpergewicht) verabreicht. Anschließend wird eine Gewebeprobe entnommen und mit Hilfe der Fluoreszenzdiagnostik untersucht. Zu diesem Zweck wird ein Fluoreszenzmikroskop eingesetzt, in dem die Probe mit blauvioletttem Licht einer Wellenlänge von etwa 400 nm bestrahlt wird und die durch das Protoporphyrin IX erzeugte Fluoreszenz durch einen professionellen Diagnostiker beobachtet und bewertet wird.

[0005] Nachteilig an den genannten Verfahren ist jedoch, daß stets ein größerer Eingriff vorgenommen werden muß, bei dem ein Endoskop eingeführt bzw. eine

Gewebeprobe entnommen werden muß. Dies führt dazu, daß diese Verfahren beispielsweise nicht als Routineuntersuchungen bei tumorgefährdeten Patienten durchgeführt werden können. Außerdem sind größere Gewebsareale oft nur schwer auf diese Weise zu untersuchen. Weiterhin nachteilig ist, daß die genannten Verfahren nur von sehr erfahrenen Ärzten durchgeführt werden können, da die einzelnen Verfahrensschritte sehr viel diagnostische Erfahrung und operative Geschicklichkeit voraussetzen.

[0006] Demgemäß ist es Aufgabe der Erfindung, eine Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung und ein Tumorzellenidentifizierungsverfahren bereitzustellen, mit der bzw. mit dem Tumore mit hoher Sicherheit und Zuverlässigkeit erkannt werden können, ohne daß ein großer Eingriff erforderlich ist und ohne daß eine so qualifizierte Arbeitskraft wie ein Arzt benötigt wird, um die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung bzw. das Tumorzellenidentifizierungsverfahren zu bedienen bzw. anzuwenden.

[0007] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung zur automatisierten in vitro Identifizierung von Tumorzellen, in denen Protoporphyrin IX angereichert ist, in einer Flüssigkeit gelöst, wobei die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung eine Lichtquelle und ein Sensorelement aufweist. In der Flüssigkeit befindliche Zellen sind durch diese Lichtquelle mit Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm gesamtheitlich oder sequentiell, von Fremdlicht abgeschlossen bestrahlbar, und durch das Sensorelement ist eine von den Zellen in der Flüssigkeit aufgrund der Bestrahlung emittierte Lichtmenge von Fluoreszenzlicht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 bis 700 nm pro Zeiteinheit gesamtheitlich oder sequentiell erfaßbar. Außerdem ist durch das Sensorelement mindestens ein für die erfaßte Lichtmenge charakteristisches Signal erzeugbar und die Flüssigkeit ist innerhalb der Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung von Fremdlicht abgeschlossen für die Bestrahlung bereitstellbar. Durch die erfindungsgemäße Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung wird folglich vermieden, daß durch Fremdlicht eine Ausbleichung erfolgt, die dazu führen würde, daß das Protoporphyrin IX in den Tumorzellen nicht mehr identifiziert werden kann.

[0008] Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung können alle Flüssigkeiten und Sekrete untersucht werden, die eine größere Anzahl von Zellen aufweisen, die von einem Gewebe stammen, mit dem die Flüssigkeiten oder die Sekrete in Berührung gekommen sind. Ist dieses Gewebe teilweise tumorös, gelangen auch Tumorzellen in die Flüssigkeit, die unter bestimmten Bedingungen mit Protoporphyrin IX angereichert sind oder beispielsweise durch Induktion mit 5-ALA in vitro mit Protoporphyrin IX angereichert werden können. Innerhalb der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung sind die in der Flüssigkeit befindlichen Zellen automatisiert mit der Anregungswellenlänge des Protoporphyrins IX be-

strahlbar. Ist unter diesen Zellen mindestens eine Tumorzelle, so emittiert diese aufgrund der Bestrahlung Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 bis 700 nm, die durch das Sensorelement erfaßbar ist. Durch das Sensorelement ist ein für die erfaßte Lichtmenge charakteristisches Signal erzeugbar, das einem Bediener der Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung, der eine nur kurz angelehrte Arbeitskraft sein kann, ein Ergebnis liefert, das von einem erfahrenen Arzt zu gegebener Zeit interpretiert werden kann. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung kann selbst eine einzige Tumorzelle erkannt werden, was zu einer äußerst frühen Erkennung von Tumoren führt. Da mit der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung Flüssigkeiten wie Körperflüssigkeiten und Sekrete untersucht werden können, sind keine der oben beschriebenen größeren chirurgischen Eingriffe bei dem Patienten erforderlich. Eine detaillierte Diagnostik, durch die die Lage und die Position des Tumors erfaßt werden kann, sollte sich an eine Identifizierung einer Tumorzelle anschließen.

**[0009]** Eine erste vorteilhafte Weiterbildung der Erfindung sieht vor, daß die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung eine Meßkammer mit einem verengten Bereich aufweist, durch den die Flüssigkeit mit einer vorbestimmten Geschwindigkeit leitbar ist, wobei jeweils mindestens eine Zelle in der Flüssigkeit innerhalb des verengten Bereiches durch die Lichtquelle bestrahlbar ist und wobei das Sensorelement so angeordnet ist, daß das durch die mindestens eine Zelle innerhalb des verengten Bereiches emittierte Licht durch das Sensorelement erfaßbar ist. Auf diese Weise können die einzelnen Zellen nacheinander bezüglich ihrer Fluoreszenz untersucht werden, und die emittierte Strahlung kann sehr genau erfaßt werden.

**[0010]** Dabei kann die Meßkammer vorteilhafterweise einen trichterförmigen Verlauf aufweisen, der in den verengten Bereich mündet. In diesem Fall kann die gesamte zu untersuchende Flüssigkeit in den trichterförmigen Verlauf gefüllt werden, von dem aus die Flüssigkeit nach und nach durch den verengten Bereich leitbar ist, in dem die eigentliche Messung stattfindet.

**[0011]** Durch den trichterförmigen Verlauf können bis zu 500 ml Flüssigkeit, insbesondere jedoch 50 bis 200 ml aufnehmbar sein. Die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung ist also auch für vergleichsweise große Volumina geeignet.

**[0012]** Eine alternative Weiterbildung der Erfindung sieht vor, daß die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung ein Gefäß aufweist, in dem die Flüssigkeit über eine Fläche verteilbar ist, wobei die Fläche mit der Lichtquelle bestrahlbar ist, wobei das über die Fläche von den Zellen in der Flüssigkeit emittierte Licht durch das Sensorelement erfaßbar ist. Auf diese Weise können die gesamten Zellen in der Flüssigkeit gleichzeitig bestrahlbar sein, so daß die Identifizierung von Tumorzellen äußerst schnell erfolgen kann:

**[0013]** Zu diesem Zweck kann die Tumorzellenidenti-

fizierungsvorrichtung mindestens ein Spiegelement aufweisen, durch das das von der Lichtquelle erzeugte Licht auf die Fläche lenkbar ist.

**[0014]** Das Gefäß kann mindestens in einem Bereich lichtdurchlässig, insbesondere für Licht der Wellenlänge 350 bis 450 nm und/oder von 600 bis 700 nm, sein. Diesen Ansprüchen genügt beispielsweise ein Gefäß aus einem geeigneten Glas, das insbesondere als Glasschale ausgebildet ist.

**[0015]** Das Anregungslicht kann folglich auch durch diesen mindestens einen Bereich des Gefäßes auf die Zellen in der Flüssigkeit gelenkt werden.

**[0016]** Um Teile der Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung bzw. die gesamte Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung von Fremdlicht abzuschließen, kann das Gefäß und/oder die Lichtquelle und/oder das Sensorelement und/oder das eine Spiegelement und/oder die Meßkammer innerhalb einer Dunkelkammer angeordnet sein.

**[0017]** Die Lichtquelle kann einen Filter aufweisen, der nur für Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm durchlässig ist, wogegen das Sensorelement mindestens einen Filter aufweisen kann, der nur für Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 bis 700 nm durchlässig ist. Durch geeignete Anordnung von Filtern kann die für die Erfindung notwendige Wellenlängenspezifität besonders günstig und einfach erreicht werden.

**[0018]** Eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, daß die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung eine Ausgabeeinheit aufweist, durch die das mindestens eine von dem Sensorelement erzeugte Signal verstärkbar und/oder umwandelbar und/oder mit einem vorbestimmten Protoporphyrin-IX-Konzentrationsgrenzwert vergleichbar ist, wobei durch die Ausgabeeinheit ein Ausgabesignal erzeugbar ist, das angibt mit welcher Wahrscheinlichkeit in der Flüssigkeit tumorsuspekte Zellen vorliegen. In dem letztgenannten Fall ist noch nicht einmal eine Interpretation des Ergebnisses durch einen erfahrenen Arzt notwendig, da auch die Auswertung automatisiert durch die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung durchführbar ist.

**[0019]** Die Flüssigkeit kann Zellen einer Spüllösung, die mit einem Gewebe eines Patienten in Berührung gekommen ist, und/oder Zellen einer Körperflüssigkeit, insbesondere Urin und/oder Blut und/oder Speichel und/oder Scheidensekret und/oder Spermienflüssigkeit und/oder Lungenauswurf und/oder Magensaft und/oder Bauchspeicheldrüsenflüssigkeit aufweisen. Als Flüssigkeit kann auch direkt eine solche Spüllösung und/oder eine solche Körperflüssigkeit eingesetzt werden. Die Wahl der Flüssigkeit hängt selbstverständlich davon ab, für welche Organe bzw. für welches Gewebe ein Tumerverdacht besteht. Die in einer Spüllösung oder in einer Körperflüssigkeit befindlichen Zellen können auch durch eine Zentrifugation angereichert werden, so daß eine große Anzahl von Zellen in einem Schritt mit der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvor-

richtung untersucht werden kann. Die durch die Zentrifugation angereicherten Zellen können auch in einer weiteren Flüssigkeit gelöst bzw. aufgenommen werden.

[0020] Die obige Aufgabe wird auch erfindungsgemäß durch ein Tumorzellenidentifizierungsverfahren zur automatisierten in vitro Identifizierung von Tumorzellen, in denen Protoporphyrin IX angereichert ist, in einer Flüssigkeit gelöst, in dem mindestens eine Zelle in der Flüssigkeit mit Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm bestrahlt wird und in dem die von der mindestens einen Zelle von der Flüssigkeit emittierte Lichtmenge von Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 bis 700 nm pro Zeiteinheit erfaßt wird und mindestens ein für die erfaßte Lichtmenge charakteristisches Signal erzeugt wird. Die Flüssigkeit wird bis zur Beendigung dieses Schrittes von Fremdlicht abgeschlossen gelagert.

[0021] Neben der Realisierung der bereits oben im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung erwähnten Funktionen kann bei einem erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsverfahren vorgesehen sein, daß die Bewegung der Flüssigkeit bei einem der genannten Verfahrensschritte oder bei beiden Verfahrensschritten durch die Schwerkraft oder eine Pumpe erfolgt.

[0022] Weiterhin wird durch die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Tumorzellen bereitgestellt, das das erfindungsgemäße Tumorzellenidentifizierungsverfahren umfaßt, jedoch zunächst einen Schritt aufweist, in dem die Tumorzellen mit Protoporphyrin IX angereichert werden. Diese Anreicherung kann beispielsweise durch 30- bis 120-minütige Inkubation mit 5-ALA in vitro, insbesondere bei 37°C, geschehen. Auf diese Weise kann eine zu einem beliebigen Zeitpunkt entnommene Flüssigkeit in Bezug auf mögliche Tumorzellen untersucht werden, ohne daß es einer Vorbehandlung des Patienten bedarf. Das Verfahren kann folglich mit jeder routinemäßig entnommenen Flüssigkeit durchgeführt werden und ist somit für prophylaktische Untersuchungen besonders geeignet.

[0023] In einer Weiterbildung dieses Verfahrens kann in Tumorzellen Protoporphyrin IX angereichert werden, indem eine Lösung, die 5-ALA aufweist, in einen Patienten instilliert wird, wobei dem Patienten eine oder die Flüssigkeit nach 30 bis 120 Minuten entnommen wird. Da das Instillieren insbesondere auch durch Inhalation oder orale Gabe erfolgen kann, ist auch diese Weiterbildung genau wie die vorher erwähnte Ausgestaltung dazu geeignet, an dem Patienten auch von einer nur kurz eingewiesenen Person durchgeführt zu werden.

[0024] Die mindestens eine Zelle kann durch mindestens einen Zentrifugationsschritt konzentriert oder auch pelletiert werden. Pelletierte Zellen können anschließend in einer Flüssigkeit, die sich besonders gut für das Tumorzellenidentifizierungsverfahren eignet, aufgenommen werden.

[0025] Im Folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung unter Hinweis auf die beigelegten Zeich-

nungen näher beschrieben. Es zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung; und  
Fig. 2 eine schematische Darstellung einer zweiten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung.

[0026] Fig. 1 zeigt schematisch dargestellt eine erste Ausführungsform der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung 10, die eine Meßkammer 12 aufweist. Diese Meßkammer 12 umfaßt einen trichterförmigen Verlauf 14 mit einer lichtundurchlässigen Wandung und einem verengten Bereich 16. Auf die Meßkammer 12 kann ein in Fig. 1 nicht gezeigter, lichtundurchlässiger Deckel aufgesetzt werden, um den Innenraum der Meßkammer 12 von jeglichem Außenlicht abzuschirmen. Werden nur sehr geringe Flüssigkeitsmengen in die Meßkammer 12 gefüllt, kann es ausreichen, lediglich den unteren Bereich der Meßkammer 12 von Außenlicht abzuschirmen. Wird eine Flüssigkeit, beispielsweise eine Urinprobe eines Patienten, in den trichterförmigen Verlauf 14 der Meßkammer 12 eingefüllt, gelangt diese nach und nach mit einer definierten Geschwindigkeit in den verengten Bereich 16 der Meßkammer 12, in dem jeweils eine Zelle oder mehrere Zellen mit Hilfe einer Lichtquelle 18 bestrahlt wird bzw. werden. Bei der Lichtquelle 18 handelt es sich üblicherweise um eine Xenon-Kurzbogenlampe oder einen Kryptonionenlaser 20 in Kombination mit einem Filter 22, der ausschließlich blauviolett Licht mit einer Wellenlänge von etwa 400 nm transmittiert. Durch das gebündelte blauviolette Licht wird in Tumorzellen, in denen Protoporphyrin IX angereichert ist und die sich in dem verengten Bereich 16 der Meßkammer 12 befinden, eine Fluoreszenz angeregt, die durch ein Sensorelement 24 erfaßbar ist. Dieses Sensorelement 24 weist einen Filter 26 und eine empfindliche Photodiode 28 auf, durch die die Intensität bzw. die Lichtmenge des roten Fluoreszenzlichtes um 630 nm pro Zeit gemessen wird. Dadurch ergibt sich ein Maß für tumorsuspekte Zellen. Eine elektronische Ausgabeeinheit 30 verstärkt und verwandelt ein von dem Sensorelement 24 erzeugtes Signal und gibt entsprechend einem einstellbaren Protoporphyrin-IX-Konzentrationsgrenzwert an, ob ein Tumorerdacht besteht oder nicht. Die Flüssigkeit läuft in einer definierten Menge pro Zeit durch den verengten Bereich 16 der Meßkammer 12, der spindelförmig ausgebildet sein kann. Dabei kann die Geschwindigkeit variierbar sein. Hat die Flüssigkeit den verengten Bereich 16 passiert, wird sie aus einer Öffnung der Meßkammer 32 ausgelassen und tropft in einen Auffangbehälter 34. Die beschriebene Ausführungsform der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung 10 kann so kompakt ausgeführt sein, daß sie als tragbares Handgerät verwendet werden kann. Die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung 10 läßt sich in diesem Fall an

jedem Ort leicht aufbauen und ist äußerst günstig herstellbar.

**[0027]** Um in den Tumorzellen Protoporphyrin IX anzureichern, wird die Flüssigkeit, in dem vorliegenden Fall eine Urinprobe, für 30 bis zu 90 Minuten bei 37°C mit 5-ALA in vitro inkubiert. Um eine Ausbleichung zu vermeiden, muß die Flüssigkeit danach lichtgeschützt aufbewahrt werden und innerhalb weniger Stunden mit der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung 10 untersucht werden.

**[0028]** Fig. 2 zeigt schematisch dargestellt eine zweite Ausführungsform der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung 10, die eine Dunkelkammer 36 umfaßt. Die Dunkelkammer 36 kann mit Hilfe von Dunkelkammerverschlüssen 38 geöffnet und wieder geschlossen werden, um eine Flüssigkeit 40 in einem Gefäß 42 in die Dunkelkammer 36 einzubringen. Die Flüssigkeit 40, beispielsweise eine Blutprobe oder eine Speichelprobe, ist innerhalb des Gefäßes 42 über eine relativ große Fläche verteilt. Bei dem Gefäß 42 handelt es sich in der hier beschriebenen Ausführungsform um eine Glasschale. Durch eine Lichtquelle 18, bestehend aus einer Xenon-Lampe 20 und einem Filter 22, wird Licht einer Wellenlänge von etwa 400 nm erzeugt, das einerseits direkt auf die Glasschale 42 und damit auf die Flüssigkeit 40 fällt und andererseits durch Spiegel 44, mit denen die Dunkelkammer 36 ausgekleidet ist, auf die Flüssigkeit 40 gelenkt wird.

**[0029]** In der Dunkelkammer 36 befindet sich auch eine äußerst empfindliche Photodiode 28 und ein Filter 26, die gemeinsam ein Sensorelement 24 bilden und selektiv rötliches Licht um 630 nm registrieren, das von den mit Protoporphyrin IX angereicherten Tumorzellen in der Flüssigkeit 40 emittiert wird. Die Ausführungsform weist daher neben den Spiegeln 44 weitere optische Elemente auf, die dazu führen, daß das Fluoreszenzlicht auf das Sensorelement 24 gelenkt wird. Eine elektronische Ausgabeeinheit 30 verstärkt und verwandelt das von dem Sensorelement 24 erzeugte Signal und gibt entsprechend einem einstellbaren Protoporphyrin-IX-Konzentrationsgrenzwert an, ob und/oder mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Tumorverdacht besteht. Auch diese Ausführungsform kann sehr kompakt ausgebildet sein und in Form eines portablen Handgerätes hergestellt werden.

**[0030]** Um in möglichen Tumorzellen innerhalb der Flüssigkeit 40 Protoporphyrin IX anzureichern, wird dem zu untersuchenden Patienten eine Lösung mit 5-ALA instilliert und die Flüssigkeit 40 nach ca. 30 Minuten bis zu 2 Stunden gewonnen. Soll, wie in dem hier aufgeführten Beispiel, eine Speichelprobe entnommen werden und sollen auf diese Weise Neoplasien in der Mundhöhle aufgespürt werden, wird 5-ALA in der Mundhöhle als Spüllösung appliziert. Dabei handelt es sich um eine 0,4-prozentige Lösung, mit der 15 Minuten lang mit Unterbrechung gespült wird. Diese Mischung aus Speichelflüssigkeit und Spüllösung kann dann mit der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvor-

richtung untersucht werden. Die hierfür nötige Betreuung und Anweisung des Patienten kann auch von einer nur kurz angelernten Person durchgeführt werden, ohne daß die Anwesenheit eines erfahrenen Mediziners notwendig ist. Dies gilt gleichermaßen auch für die Bedienung der erfindungsgemäßen Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung. Für eine Untersuchung einer Körperflüssigkeit kann eine orale Verabreichung von 5-ALA, wie etwa 10 mg pro kg Körpergewicht, zu einer ausreichenden Anreicherung von Protoporphyrin IX in den Tumorzellen dieser Körperflüssigkeit führen.

**[0031]** Weitere Veränderungen, Modifikationen oder Kombinationen der oben beschriebenen Ausführungsformen sind für den Fachmann offensichtlich und fallen ebenso unter den Schutzzumfang der beigefügten Ansprüche.

## Patentansprüche

1. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung zur automatisierten in vitro Identifizierung von Tumorzellen, in denen Protoporphyrin IX angereichert ist, in einer Flüssigkeit, wobei die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) eine Lichtquelle (18) und ein Sensorelement (24) aufweist, wobei in der Flüssigkeit befindliche Zellen durch die Lichtquelle (18) mit Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm gesamtheitlich oder sequentiell, von Fremdlicht abgeschlossen bestrahlbar sind, wobei durch das Sensorelement (24) eine von den Zellen in der Flüssigkeit aufgrund der Bestrahlung emittierte Lichtmenge von Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 bis 700 nm pro Zeiteinheit gesamtheitlich oder sequentiell erfaßbar ist und mindestens ein für die erfaßte Lichtmenge charakteristisches Signal erzeugbar ist, wobei die Flüssigkeit innerhalb der Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) von Fremdlicht abgeschlossen für die Bestrahlung bereitstellbar ist.
2. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) eine Meßkammer (12) mit einem verengten Bereich (16) aufweist, durch den die Flüssigkeit mit einer vorbestimmten Geschwindigkeit leitbar ist, wobei jeweils mindestens eine Zelle in der Flüssigkeit innerhalb des verengten Bereiches (16) durch die Lichtquelle (18) bestrahlbar ist und wobei das Sensorelement (24) so angeordnet ist, daß das durch die mindestens eine Zelle innerhalb des verengten Bereiches (16) emittierte Licht durch das Sensorelement (24) erfaßbar ist.

3. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach Anspruch 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Meßkammer (12) einen trichterförmigen Verlauf (14) aufweist, der in den verengten Bereich (16) mündet. 5
4. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der Ansprüche 2 oder 3,  
**dadurch gekennzeichnet,** 10  
**daß** durch den trichterförmigen Verlauf (14) bis zu 500 ml Flüssigkeit, insbesondere 50 ml bis 200 ml, aufnehmbar sind.
5. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach Anspruch 1, 15  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) ein Gefäß (42) aufweist, in dem die Flüssigkeit (40) über eine Fläche verteilbar ist, wobei die Fläche mit der Lichtquelle (18) bestrahlbar ist, wobei das über die Fläche von den Zellen in der Flüssigkeit (40) emittierte Licht durch das Sensorelement (24) erfassbar ist. 20
6. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach Anspruch 5, 25  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) mindestens ein Spiegelement (44) aufweist, durch das das von der Lichtquelle (18) erzeugte Licht auf die Fläche lenkbar ist. 30
7. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 oder 6, 35  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** das Gefäß (42) aus Glas besteht, insbesondere eine Glasschale ist.
8. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, 40  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** das Gefäß (42) mindestens in einem Bereich lichtdurchlässig, insbesondere für Licht der Wellenlänge 350 nm bis 450 nm und/oder von 600 nm bis 700 nm, ist. 45
9. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, 50  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** das Gefäß (42) und/oder die Lichtquelle (18) und/oder das Sensorelement (24) und/oder das mindestens eine Spiegelement (44) und/oder die Meßkammer (12) innerhalb einer Dunkelkammer (36) angeordnet ist. 55
10. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Lichtquelle (18) mindestens einen Filter (22) aufweist, der nur für Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm durchlässig ist.
11. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** das Sensorelement (24) mindestens einen Filter (26) aufweist, der nur für Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 nm bis 700 nm durchlässig ist.
12. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) eine Ausgabeeinheit (30) aufweist, durch die das mindestens eine von dem Sensorelement (24) erzeugte Signal verstärkbar und/oder umwandelbar und/oder mit einem vorbestimmten Protoporphyrin-IX-Konzentrationsgrenzwert vergleichbar ist, wobei durch die Ausgabeeinheit (30) ein Ausgabesignal erzeugbar ist, das angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit in der Flüssigkeit mindestens eine Tumorzelle vorliegt.
13. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Flüssigkeit Zellen einer Spüllösung, die mit einem Gewebe eines Patienten in Berührung gekommen ist, und/oder Zellen einer Körperflüssigkeit, insbesondere Urin und/oder Blut und/oder Speichel und/oder Scheidensekret und/oder Spermienflüssigkeit und/oder Lungenauswurf und/oder Magensaft und/oder Bauchspeicheldrüsenflüssigkeit aufweist.
14. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach Anspruch 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Flüssigkeit die Spüllösung und/oder die Körperflüssigkeit ist.
15. Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Tumorzellenidentifizierungsvorrichtung (10) kompakt, insbesondere tragbar, ausgebildet ist.
16. Tumorzellenidentifizierungsverfahren zur automatisierten in vitro Identifizierung von Tumorzellen, in denen Protoporphyrin IX angereichert ist, in einer Flüssigkeit, folgende Schritte umfassend:  
a) Bestrahlen mindestens einer Zelle in der

Flüssigkeit mit Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 400 nm; und

b) Erfassen der von der mindestens einen Zelle in der Flüssigkeit emittierten Lichtmenge von Licht einer Wellenlänge von im Wesentlichen 630 nm bis 700 nm pro Zeiteinheit und Erzeugen mindestens eines für die erfaßte Lichtmenge charakteristischen Signals;

wobei die Flüssigkeit vor Beendigung von Schritt b) von Fremdlicht abgeschlossen gelagert wird.

17. Tumorzellenidentifizierungsverfahren nach Anspruch 16,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Flüssigkeit vor und/oder während und/oder nach der Durchführung von Schritt a) und/oder Schritt b) bewegt wird.

18. Tumorzellenidentifizierungsverfahren nach Anspruch 17,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die Bewegung durch die Schwerkraft oder eine Pumpe erfolgt.

19. Tumorzellenidentifizierungsverfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die mindestens eine Zelle einen Anteil einer Zellgesamtheit in der Flüssigkeit darstellt und die Schritte a) und b) nacheinander mit sämtlichen Anteilen der Zellgesamtheit durchgeführt werden.

20. Tumorzellenidentifizierungsverfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** das mindestens eine Signal in mindestens einem weiteren Schritt verstärkt und/oder umgewandelt und/oder mit einem vorbestimmten Protoporphyrin-IX-Konzentrationsgrenzwert verglichen wird, wobei ein Ausgabesignal erzeugt wird, das angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit in der Flüssigkeit mindestens eine Tumorzelle vorliegt.

21. Verfahren zur Identifizierung von Tumorzellen, das das Tumorzellenidentifizierungsverfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20 umfaßt, wobei das Verfahren zunächst folgenden Schritt umfaßt:

- Anreichern von Protoporphyrin IX in den Tumorzellen.

22. Verfahren nach Anspruch 21,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** in den Tumorzellen durch 30 bis 120 minütige Inkubation mit 5-Aminolävulinat (5-ALA) in vitro, insbesondere bei 37°C, Protoporphyrin IX angerei-

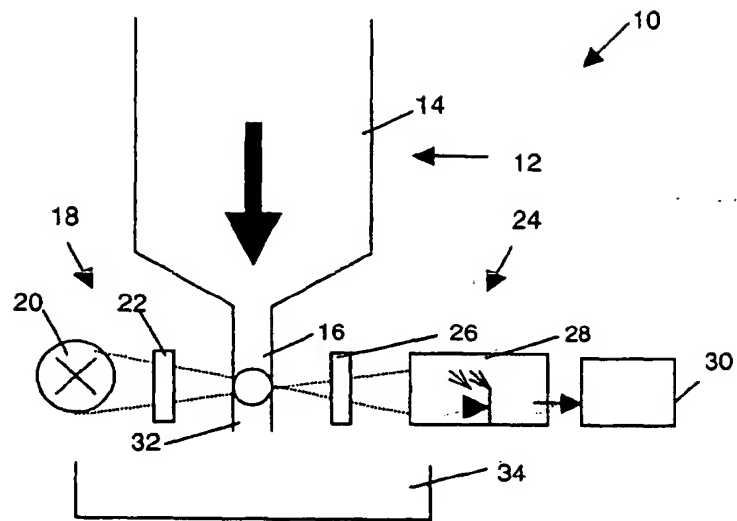
chert wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 oder 22,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** in den Tumorzellen Protoporphyrin IX angereichert wird, indem eine Lösung, die 5-Aminolävulinat (5-ALA) aufweist, in einen Patienten instilliert wird und nach 30 bis 120 min eine oder die Flüssigkeit entnommen wird.

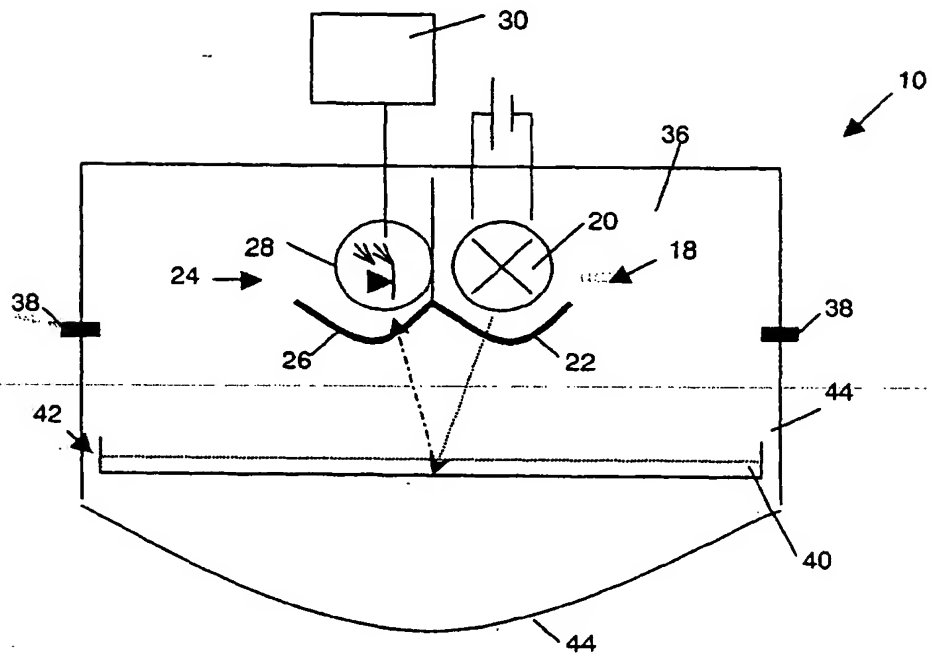
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
**daß** die mindestens eine Zelle durch mindestens einen Zentrifugationsschritt konzentriert wird.



**Fig.1**



**Fig.2**





Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 00 12 4107

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE  |   |   |   |
|---|---|---|---|
| Kategorie   | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile   | Betrifft Anspruch   | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7) |
| Y   | US 5 955 490 A (POTTIER ROY H ET AL)<br>21. September 1999 (1999-09-21)<br>* Spalte 1, Zeile 25 - Zeile 35 *<br>* Spalte 10, Zeile 5 - Zeile 15 *<br>* Spalte 15, Zeile 1 - Zeile 5 *<br>* Spalte 16, Zeile 25 - Spalte 17, Zeile 5 *   | 1-24  | G01N21/64<br>A61K41/00<br>A61K49/00     |
| Y   | US 5 411 891 A (FAN SOPHIE S ET AL)<br>2. Mai 1995 (1995-05-02)<br>* Spalte 1, Zeile 10 - Zeile 20 *<br>* Spalte 3, Zeile 25 - Zeile 35 *   | 1-24  |   |
| A   | WO 97 08523 A (VIVORX PHARMACEUTICALS INC ;SPAULDING GLENN F (US))<br>6. März 1997 (1997-03-06)<br>* Abbildung 2 *  | 1-24  |   |
| A   | US 4 608 990 A (ELINGS VIRGIL B)<br>2. September 1986 (1986-09-02)<br>* Spalte 5, Zeile 1 - Zeile 20 *  | 1-24  |   |
| A   | DE ROSA F S ET AL: "A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy"<br>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, Bd. 65, Nr. 3, April 2000 (2000-04), Seiten 359-366, XP004190334<br>ISSN: 0168-3659<br>* Seite 361 - Seite 363 * | 1-24  | G01N<br>A61K                            |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt   |   |   | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)    |
| Recherchenort<br><b>MÜNCHEN</b>   |   | Abschlußdatum der Recherche<br><b>6. April 2001</b>   | Prüfer<br><b>Mason, W</b>               |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE<br>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet<br>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie<br>A : technologischer Hintergrund<br>O : nichtschriftliche Offenbarung<br>P : Zwischenliteratur |   | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze<br>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument<br>I : aus anderen Gründen angeführtes Dokument<br>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument |   |

EP-Form 1503 03 82 (P04C03)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 00 12 4107

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE  |   |   |   |
|---|---|---|---|
| Kategorie   | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile   | Betrifft Anspruch                                   | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7) |
| A   | WO 96 39188 A (UNIV KINGSTON)<br>12. Dezember 1996 (1996-12-12)<br>* Seite 29 - Seite 32; Anspruch 1 *  | 1-24  |   |
| A   | US 6 034 267 A (PENG QIAN ET AL)<br>7. März 2000 (2000-03-07)<br>* Spalte 8-9 *   | 1-24  |   |
| A   | US 3 973 129 A (BLUMBERG WILLIAM EMIL ET AL)<br>3. August 1976 (1976-08-03)<br>* Spalte 3, Zeile 25 - Zeile 35; Ansprüche 1, 12 *<br>* Spalte 8, Zeile 1 - Zeile 20 * | 1-24  |   |
|   |   |   | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)    |
|   |   |   |   |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt   |   |   |   |
| Recherchenort<br><b>MÜNCHEN</b>   |   | Abschlußdatum der Recherche<br><b>6. April 2001</b> | Prüfer<br><b>Mason, W</b>               |
| <p><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b></p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet<br/> Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie<br/> A : technologischer Hintergrund<br/> O : nichtchriftliche Offenbarung<br/> P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze<br/> E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br/> D : in der Anmeldung angeführtes Dokument<br/> L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument<br/> B : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p> |   |   |   |

EP FORM 1503 03 02 (P0403)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 00 12 4107

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

06-04-2001

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5955490 A                                       | 21-09-1999                    | US 5422093 A                      | 06-06-1995                    |
|  |                               | US 5234940 A                      | 10-08-1993                    |
|  |                               | US 5211938 A                      | 18-05-1993                    |
|  |                               | US 5079262 A                      | 07-01-1992                    |
|  |                               | AU 5888796 A                      | 24-12-1996                    |
|  |                               | CA 2223522 A                      | 12-12-1996                    |
|  |                               | WO 9639188 A                      | 12-12-1996                    |
|  |                               | EP 0831909 A                      | 01-04-1998                    |
|  |                               | CA 2126761 A                      | 29-12-1994                    |
|  |                               | AU 674310 B                       | 19-12-1996                    |
|  |                               | AU 3883293 A                      | 18-11-1993                    |
|  |                               | CA 2133741 A                      | 28-10-1993                    |
|  |                               | WO 9320810 A                      | 28-10-1993                    |
|  |                               | EP 0634929 A                      | 25-01-1995                    |
|  |                               | NO 943774 A                       | 01-12-1994                    |
|  |                               | NZ 251284 A                       | 27-07-1997                    |
|  |                               | AU 624985 B                       | 25-06-1992                    |
|  |                               | AU 6034390 A                      | 11-03-1991                    |
|  |                               | WO 9101727 A                      | 21-02-1991                    |
|  |                               | JP 2731032 B                      | 25-03-1998                    |
|  |                               | JP 4500770 T                      | 13-02-1992                    |
|  |                               | KR 178277 B                       | 20-03-1999                    |
|  |                               | NL 9021172 T                      | 01-07-1991                    |
| US 5411891 A                                       | 02-05-1995                    | US 5360739 A                      | 01-11-1994                    |
|  |                               | AT 161953 T                       | 15-01-1998                    |
|  |                               | AU 680143 B                       | 17-07-1997                    |
|  |                               | AU 2483595 A                      | 14-12-1995                    |
|  |                               | AU 2816792 A                      | 10-06-1993                    |
|  |                               | CA 2077789 A,C                    | 06-06-1993                    |
|  |                               | DE 69223931 D                     | 12-02-1998                    |
|  |                               | DE 69223931 T                     | 30-04-1998                    |
|  |                               | DK 545315 T                       | 07-09-1998                    |
|  |                               | EP 0545315 A                      | 09-06-1993                    |
|  |                               | ES 2111600 T                      | 16-03-1998                    |
|  |                               | IL 103055 A                       | 13-07-1997                    |
|  |                               | JP 6180315 A                      | 28-06-1994                    |
|  |                               | JP 8027277 B                      | 21-03-1996                    |
|  |                               | KR 258394 B                       | 01-06-2000                    |
| WO 9708523 A                                       | 06-03-1997                    | AU 6853696 A                      | 19-03-1997                    |
|  |                               | CA 2229458 A                      | 06-03-1997                    |
|  |                               | EP 0866953 A                      | 30-09-1998                    |
|  |                               | JP 11511557 T                     | 05-10-1999                    |
| US 4608990 A                                       | 02-09-1986                    | KEINE                             |                               |

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang: siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 00 12 4107

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

06-04-2001

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9639188 A                                       | 12-12-1996                    | US 5955490 A                      | 21-09-1999                    |
|  |                               | AU 5888796 A                      | 24-12-1996                    |
|  |                               | CA 2223522 A                      | 12-12-1996                    |
|  |                               | EP 0831909 A                      | 01-04-1998                    |
| US 6034267 A                                       | 07-03-2000                    | AU 708076 B                       | 29-07-1999                    |
|  |                               | AU 4950096 A                      | 02-10-1996                    |
|  |                               | CA 2215069 A                      | 19-09-1996                    |
|  |                               | CZ 9702848 A                      | 18-03-1998                    |
|  |                               | EP 0820432 A                      | 28-01-1998                    |
|  |                               | WO 9628412 A                      | 19-09-1996                    |
|  |                               | HU 9800460 A                      | 28-07-1998                    |
|  |                               | JP 11501914 T                     | 16-02-1999                    |
|  |                               | NO 974163 A                       | 09-09-1997                    |
| US 3973129 A                                       | 03-08-1976                    | KEINE                             |                               |

EPO FORM P0161

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82